BEITRAG ZUR KENNTNIS VON SCLEROTINIA LIBERTIANA

Inauguraldissertation

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Franz Hediger

aus Basel

Basel · Buchdruckerei H. Brodbeck-Frehner · 1942

BEITRAG ZUR KENNTNIS VON SCLEROTINIA LIBERTIANA

Inauguraldissertation

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Franz Hediger

aus Basel

Basel · Buchdruckerei H. Brodbeck-Frehner · 1942

Genehmigt von der
Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der
Herren Professoren K. Leupin und T. Reichstein.

Basel, den 17. Mai 1941.

W. Kuhn, Dekan.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Die vorliegende Dissertation wurde in der
pharmazeutischen Anstalt der Universität Basel
ausgeführt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht,
meinem hochverehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. KURT LEUPIN

für die wohlwollende Unterstützung und Förderung
meiner Arbeit den herzlichsten Dank auszusprechen.

Ebenso bin ich dem Vorsteher der
pharmakologischen Abteilung der Firma Sandoz A.G.,

Herrn Professor Dr. E. ROTHLIN

für seine geschätzte Mithilfe
zu grossem Dank verpflichtet.

Meinen Eltern

aus Dankbarkeit

gewidmet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546710_0052

INHALTSANGABE.

I. Einleitung 9
II. Botanisch-Phytopathologischer Teil 10
III. Chemischer Teil 15

A. Voruntersuchungen 15
1. Die Bestimmung der Trockensubstanz 15
2. Die Bestimmung des Aschengehaltes und der in Salzsäure unlöslichen Asche 16
3. Die Bestimmung des Extraktgehaltes 18

B. Hauptuntersuchungen 19
1. Vorproben 19
a) Prüfung des pH 20
b) Prüfung auf Gerbstoffe 20
c) Prüfung auf Fällbarkeit mit Bleiazetat und Bleiessig 20
d) Prüfung auf reduzierende Substanzen 20
e) Prüfung auf Alkaloide 20
f) Prüfung auf Saponine 21
g) Prüfung auf Glykoside 21
h) Wasserdampfdestillation 21
i) Mikrosublimation 22

2. Eigentliche Untersuchungen 23
a) Untersuchung des Petrolätherextraktes 23
aa) Prüfung auf Alkaloide und Glykoside . . . 23
bb) Bestimmung der Säurezahl 24
cc) Bestimmung der Verseifungszahl 24
dd) Bestimmung des Unverseifbaren und Prüfung auf Sterine 24
ee) Bestimmung der Fettsäuren 26
Feste Fettsäuren 27
Flüssige Fettsäuren 28
ff) Nachweis von Glyzerin 29
b) Untersuchung des Aetherextraktes 29
c) Untersuchung des mit 95%-igem Spiritus erhaltenen Extraktes 30

d) Untersuchung des mit 75%-igem Methylalkohol erhaltenen Extraktes 30
aa) Nachweis von Zitronensäure 30
bb) Nachweis von Oxalsäure 31
cc) Prüfung auf Alkaloide und Glykoside . . . 31
dd) Nachweis von Mannit 32
ee) Nachweis von Kaliumchlorid 32
e) Quantitative Mannitbestimmung 33
IV. Pharmakologischer Teil 33
V. Zusammenfassung 41
VI. Literaturangaben 42

I. EINLEITUNG.

In einer Arbeit aus dem Jahre 1930 berichtet Sokolov (1) über die Wirkung von Sclerotinia Libertiana-Extrakten auf Organe verschiedener Tiere. Die Droge „wirkt giftig, geringer, aber gleichartig wie Mutterkorn". Auf Grund dieser Arbeit hat Seka (2) die genannte Sclerotinia-Art bei den alkaloidhaltigen Pilzen eingereiht, wobei er vermerkt, dass die Konstitution der Alkaloide noch der Abklärung bedürfe.

Da uns ein grösserer Posten Sklerotien von Sclerotinia Libertiana zur Verfügung stand, lag der Gedanke nahe, Inhaltsstoffe und Wirkung dieses weitverbreiteten Pflanzenschädlings einer Untersuchung zu unterwerfen, um eventuell eine neue Quelle für Alkaloide vom Mutterkorntypus oder einen Ersatz für das in grösseren Mengen oft schwer erhältliche Mutterkorn zu finden. Auch sonst schien eine allgemeine Untersuchung des Pilzes von Interesse zu sein, da in der ganzen Literatur keine derartige Arbeit zu finden ist.

Das uns vorliegende Material stammt aus Holland, wo der Pilz bei ungünstigen Witterungs- und Bodenverhältnissen in grösserem Ausmasse auf Kümmelpflanzen auftritt. Die kleinen, grauen Sklerotien, die sich in einer Kümmelsendung vorfanden, wurden zuerst für Mäuseexkremente gehalten. Erst beim näheren Zusehen wurde erkannt, dass es sich um Sklerotien irgend eines Pilzes handeln müsste. Herr Professor Lendner (Genf) hat die ihm zugesandten Exemplare als Sklerotien der Gattung Sclerotinia Libertiana Fuckel identifiziert. Durch Vermittlung der Firma Bohny & Co., Basel, der wir auch an dieser Stelle für ihre Bemühungen den herzlichsten Dank aussprechen wollen, gelang es dann, einen weiteren, grösseren Posten der Droge zu erhalten. Das Material war in sehr starkem Masse mit Kümmelfrüchten, Getreidekörnern, den Früchten einer Galium-Art, Erde, Sand und Steinchen verunreinigt und konnte erst, nachdem es von Hand erlesen war, zu weiteren Untersuchungen dienen.

Die Arbeit Sokolovs ist die einzige, die sich mit der pharmakologischen Wirkung von Extrakten befasst. Alle übrigen Autoren behandeln die Pflanze nur vom botanischen oder phytopathologischen Standpunkt aus.

Es soll darum in der vorliegenden Dissertation versucht werden, neben einer kurzen Zusammenfassung der botanischen Literatur mit Hinweis auf die wichtigsten Arbeiten und eigenen Ergänzungen, hauptsächlich auf die Inhaltsstoffe und die Wirkung der Extrakte einzugehen.

Zur besseren Übersicht haben wir unsere Arbeit in drei Teile aufgeteilt, nämlich in:

1. einen botanisch-phytopathologischen Teil,
2. einen chemischen Teil, und
3. einen pharmakologischen Teil.

Die pharmakologischen Versuche wurden in den Laboratorien der Firma Sandoz A. G., Basel, unter der Leitung von Herrn Professor Dr. E. Rothlin durchgeführt. Für das freundliche Entgegenkommen, sowie die wohlwollende Unterstützung und Förderung der Arbeit, sei Herrn Prof. Rothlin auch an dieser Stelle der herzlichste Dank ausgesprochen.

II. BOTANISCH-PHYTOPATHOLOGISCHER TEIL.

Der Pilz Sclerotinia gehört zu den verbreitetsten Pflanzenschädlingen. Über sein Auftreten liegen Berichte aus fast allen Kulturstaaten vor.

Seine weite Verbreitung verdankt der Pilz wohl dem Umstand, dass sein Wachstum nicht an eine bestimmte Wirtspflanze gebunden ist, sondern dass er auf einer ausserordentlich grossen Zahl von verchiedenen Kulturpflanzen gedeiht und durch seinen Befall dieselben schädigt oder zerstört.

Er wurde unter anderem im Freien beobachtet auf: Salat, Kohl, Garten- und Sojabohnen, Gurken, Tomaten, Kümmel, Petersilien, Zichorie, Tabak, Topinambur, Sonnenblumen, Dahlien, Zinnien, Petunien, Iris, Aralia cordata (J. L. Weimer (3)), Erysinium Perowskianum (A. Osterwalder (4)), Forsythia viridissima (V. Peglion (5)), Campanula medium (A. Osterwalder (6)), Ginseng (J. Rosenbaum (7)), Citronen, Möhren, Raps, Rüben, Senf, ausserdem in Aufbewahrungsräumen auf lagernden Daucus-, Brassica-, Betarüben, Zichorienwurzeln, Sellerieknollen, u. a. m.

Es ist darum nicht weiter erstaunlich, dass dieser Schädling immer wieder Veranlassung zu Studien, vor allem phytopathologischer Art, gegeben hat.

Eine genaue Beschreibung des Krankheitsbildes bei Tomaten gibt Pape (8). Nach diesem Autor werden die Tomatenpflanzen von der Krankheit befallen, wenn sie ungefähr eine Höhe von 80 bis 100 cm haben. Die Erkrankung kleinerer Pflänzchen scheint im Freien nur sehr selten oder gar nicht vorzukommen, obwohl Sclerotinia Libertiana auch ganz junge Sämlinge anzugreifen vermag, was Kulturversuche von de Bary (9) bewiesen haben.

Die ersten Anzeichen des Befalls äussern sich in graubraun oder weisslichgelb verfärbten Stellen an den Stengeln der Wirtspflanze. Die Infektionsherde befinden sich eigenartigerweise immer etwa 10—15 cm über dem Erdboden. Nur selten wurden die ersten Anfänge der Krankheit an noch höheren Stellen, nämlich an 30—40 cm über dem Erdboden gelegenen Seitenästen beobachtet. Diese Beobachtung ist für die Erforschung der Verbreitungsart des Pilzes, auf die wir an späterer Stelle zurückkommen werden, sehr wichtig.

Nach verschiedenen anderen Autoren soll zuerst die Wurzel befallen werden. Diese beginne zu faulen, worauf die Pflanze von unten her absterbe. Pape hat diese Art des Krankheitsbildes nicht beobachten können.

Die kranke Stelle vergrössert sich mit dem Fortschreiten der Krankheit mehr und mehr, umfasst den Stengel allmählich ringsum und bringt so die Pflanze zum Welken. Die Ansteckung eines neben der kranken Pflanze stehenden Individuums, zum Beispiel durch Berühren der Seitenäste, ist durchaus möglich und auch mehrfach festgestellt worden. Die Rinde der erkrankten Stengel ist oft aufgerissen und zerfasert. Bei grosser Feuchtigkeit tritt gewöhnlich an der kranken Stelle weisses, flockiges Pilzmyzel hervor. Auch das Mark wird durch den Pilz mehr oder weniger zerstört, und im Markraum finden sich die schwarzen, rundlichen Sklerotien. Diese sind in der Regel flache, kuchenförmige Körper von unregelmässiger, oft länglicher Form. Der Flächendurchmesser eines Sklerotiums beträgt zwischen einigen Millimetern und 1 cm, die Dicke 1 bis mehrere Millimeter. Aber auch Abweichungen von dieser normalen Form sind häufig. So wurden schon über 3 cm grosse Brocken beobachtet. Anderseits trifft man auch nur stecknadelkopfgrosse Exemplare. Die Oberfläche ist mattgrau bis schwarz, uneben und höckerig.

Wie der Längsschnitt, zeigt auch der Querschnitt durch die Sklerotien das vom Mutterkorn her bekannte Bild: Pseudoparenchymatisches Gewebe, welches aus den sehr fest verflochtenen, ziemlich dickwandigen Hyphen des Pilzes besteht und gegen die Aussenseite hin dunkel gefärbt ist. Eine scharfe Abgrenzung nach aussen, etwa in Form eines epidermisartigen Gewebes fehlt vollständig.

Diese Sklerotien, welche eine Pilzdauerform darstellen, gelangen nach dem Absterben der Pflanze im Herbst in den Boden, wo sie den Winter über liegen bleiben. Im nächsten Frühjahr oder Sommer wachsen bei genügender Feuchtigkeit die Apothecien daraus hervor. Je nach Grösse und Entwicklungsbedingungen sind es pro Sklerotium eines oder mehrere. Die Apothecien stehen auf einem 2—3 cm langen, glatten, zylindrischen Stiel und besitzen eine 4—8 cm breite blassbräunliche Scheibe. Das Aussehen der Apothecien gleicht am ehesten demjenigen eines Trichters oder einer Trompete. Die Innenfläche des Trichters ist mit dem sich bildenden Hymenium bedeckt. Die in den Asci, die eine Länge von 130 bis 135 μ und eine Breite von 8—10 μ haben, ausgebildeten Sporen sind oval bis ellipsoidisch gestaltet, etwa 9—13 μ lang und 4—6 μ breit. Sie sind farblos, haben eine dünne, glatte Membran und einen homogenen Protoplasmainhalt. Der Zellkern lässt sich direkt nicht deutlich unterscheiden. Meistens sind ein oder zwei stark lichtbrechende Körner oder „Fettröpfchen" an den Enden erkennbar.

Nach Ansicht einiger Autoren gehört zu Sclerotinia Libertiana auch eine Botrytiskonidienform, die als Botrytis vulgaris angesprochen wird. Bereits de Bary (l. c.) bezweifelt dies aber, und auch neuere Forschungen wie diejenigen von Appel und Bruck (10), Burgwitz und Eremejeva (11) und Davis (12) zeigen, dass jene Ansicht, die vor allem von Frank (13) vertreten wurde, nicht haltbar ist.

Die Verbreitung des Pilzes geschieht hauptsächlich durch die Sporen, die in sehr grosser Zahl aus den Asci geschleudert werden. Fallen sie auf für ihr Wachstum günstigen Boden, so können sie sofort keimen und wachsen zu Schläuchen aus. Ist nur Wasser vorhanden, so werden sie ein paarmal länger als die Spore, bilden wohl auch eine Zweigansackung, dann aber steht das Wachstum still. Anders ist das Verhalten in Nährlösungen. Die Keimschläuche wachsen hier zu verzweigten Myzelfäden heran und bilden so, wenn genügend Nahrung vorhanden ist, ein stattliches Mycelium, auf welchem ebenfalls Sklerotien erzeugt werden.

Der Bau der Myzelfäden ist bei guter Ernährung sehr charakteristisch. Man beobachtet farblose, dickwandige bis 16 μ und darüber stark werdende Hauptverzweigungen, die durch viele Querwände in zahlreiche, ungleich grosse Zellen eingeteilt sind. Die Seitenäste sind gleicher Art, nur dünner. Auffallend sind die, durch reichliches Aussprossen kurzzelliger Seitenzweige sich bildenden Haftbüschel, die wohl hauptsächlich der Ernährung des Myzels dienen.

Die Membranen der Hyphen sind farblos und an der Oberfläche glatt. Im Alter sind sie sehr oft von Kalziumoxalatkristallen

inkrustiert. Der Protoplasmakörper der lebenden Hyphen ist ebenfalls farblos und an den jungen Verzweigungen von sehr homogenem Aussehen, an den stärkeren Ästen jedoch oft durch sehr viele kleine Vakuolen in charakteristischer Weise fein „netzförmigschaumig".

Das Myzel tötet nach de Bary (l. c.) das befallene Gewebe nicht durch unmittelbare Berührung ab, sondern durch das Ausscheiden eines für die Wirtspflanze giftigen Enzyms, das schon in weitem Umkreis die Zellen zum Absterben bringt. Diese liefern so nicht nur die für das Wachstum des Myzels notwendigen Stoffe, sondern ermöglichen auch das Eindringen des Pilzes in die Wirtspflanze. Allerdings scheint das Vorkommen dieses, auch die Cuticula lösenden Enzyms nicht ganz sicher zu sein, denn Boyle (14) kommt auf Grund zahlreicher Versuche zu einer anderen Ansicht als de Bary. Nach Boyle kann das Myzel sehr wohl auch ohne vorherige enzymatische Zerstörung des Gewebes in dieses eindringen.

Ein weiterer Grund zu Meinungsverschiedenheiten bildet die Frage, ob die Infektion gesunder Pflanzen durch die Sporen, oder erst durch das aus diesen entstehende Myzel möglich ist. De Bary (l. c.) vertritt die Ansicht, dass die Infektion der gesunden Pflanze durch die Keimschläuche der Ascosporen nicht ohne weiteres möglich sei, sondern, dass sie erst noch der Förderung durch saprophytische Ernährung in Nährlösungen oder auf toter Pflanzensubstanz bedürfen. So wuchs zum Beispiel das Myzel auf gesunden Mohrrüben nur kümmerlich, und die Möhren blieben wochenlang gesund. Sobald aber Stücke des Gewebes durch Verbrühen abgetötet wurden, fand üppiges Wachstum des Myzels und auch eine Zerstörung des gesunden Teiles statt. Ebenso erfolgte eine schnelle Infektion, wenn die Sporen mit einem Tropfen Nährlösung auf die Oberfläche der betreffenden Pflanzenteile gebracht wurden. Dabei tötete das Myzel und namentlich die quastenförmigen Büschel das Gewebe ab. Ohne Hinzufügen von Nährlösung gelang es de Bary fast nie, die Krankheit mit den Schlauchsporen auf der Wirtspflanze zu erzeugen.

Nach Westerdijk (15) soll der Pilz für seinen Entwicklungsgang das Schlauchporenstadium überhaupt entbehren können; es soll aus den im Boden liegenden Sklerotien Myzel hervorwachsen, durch welches die Pflanzen vom Boden aus befallen werden. Wenn auch experimentell mit Myzel leichter Infektionen erzielt werden, als durch Sporen, so darf doch angenommen werden, dass in der Natur Infektionen durch Schlauchsporen verhältnismässig leicht zu Stande kommen. Pape (l. c.) vertritt sogar die Ansicht, dass in den von ihm beobachteten Fällen die Infektion der Tomatenpflanzen durch den Pilz regelmässig durch Schlauchsporen erfolgt sein

dürfte; denn, wie oben erwähnt, waren stets nur in beträchtlicher Entfernung über der Erde gelegene Teile befallen, zu denen Myzel vom Boden aus schwerlich gelangt sein konnte.

Es ist nicht der Zweck dieser Arbeit, die vorgenannten Streitfragen abzuklären. Auch soll nicht weiter darauf eingegangen werden, ob zwei geographische Rassen von Sclerotinia Libertiana vorkommen, wie dies von Antokolskaja (16) behauptet wird. Immerhin mögen die verschiedenen Arbeiten erwähnt sein, um die Untersuchungen über den Pilz so vollständig wie möglich zu gestalten.

Von grosser Wichtigkeit ist auch das Vorkommen von Sclerotinia Libertiana auf eingekellertem Wurzelgemüse, zum Beispiel Rüben, Möhren, Sellerie, Schwarzwurzeln usw. An diesen Pflanzen zeigen sich faulige Stellen, die zum Teil mit einem weissen, bis 1 cm hohen Hyphenbelag überzogen sind. Hat das Myzel ungefähr eine Woche vegetiert, so bilden sich die schon beschriebenen Sklerotien in sehr grosser Zahl. Die Sklerotien können längere Zeit (ungefähr zwei bis drei Jahre) ruhen, bis sie, nach Änderung der Lebensbedingungen, die Apothecien entwickeln. Aber auch das Myzel kann in Mauerritzen, im Boden des Kellers usw. den Sommer überdauern, um im Herbst frisch eingelagerte Wurzelfrüchte zu befallen.

Bei den Kartoffeln ruft der Pilz eine ausgesprochene Stengelerkrankung hervor, die namentlich in Irland sehr verbreitet und dort als „Stalk Disease" - - auch als „Sclerotium Disease", „White Spot", „Falling at the Butt" oder „Honghing" bekannt ist. Pethybridge (17) gibt eine genaue Beschreibung des Krankheitsbildes, das von einigen Kleinigkeiten abgesehen, sehr demjenigen bei Tomaten gleicht.

Als weitere wichtige Stengelerkrankungen, die durch Sclerotinia Libertiana hervorgerufen werden, sollen noch der „Hanfkrebs", der von Tichomiroff (18) und Behrens (19) untersucht worden ist, sowie der „Rapskrebs", über den Untersuchungen von Frank (l. c.) vorliegen, erwähnt werden.

Die zitierten Beispiele zeigen, auf wie vielen verschiedenen Wirtspflanzen das Wachstum des Pilzes möglich ist. De Bary (l. c.) gelangt auf Grund zahlreicher Infektionsversuche an jungen Keimlingen in „Anzuchtkästen" sogar zur Ansicht, dass die Keimlinge aller Dicotyledonen von der Krankheit befallen werden können.

Auf die Bekämpfung des Schädlings soll in der vorliegenden Arbeit nicht eingegangen werden. Es sei aber auf die, dieses Thema eingehend behandelnden Arbeiten von Noack (20), Pape (l. c.) und Peters (21) hingewiesen.

III. CHEMISCHER TEIL.

A. Voruntersuchungen.

Da über die Inhaltsstoffe der Sklerotien von Sclerotinia Libertiana keine Arbeiten vorliegen, sahen wir uns bei der Wahl der Arbeitsmethoden genötigt, einen Analysengang zu wählen, der vielleicht für einzelne Bestandteile nicht der absolut beste ist, der aber Gewähr bietet, dass alle wichtigen Einzelbestandteile der Droge erfasst werden können.

Einen solchen Arbeitsgang fanden wir in dem Buche von G. Klein (22). Die gleiche Methode wurde von O. Dafert (23) und L. Rosenthaler (24), sei es unverändert, sei es ausführlicher oder gekürzt, übernommen. Der Gang ist in mehrere Teile gegliedert, vorab in zwei Hauptteile, die sogenannten Voruntersuchungen und die Hauptuntersuchungen, welche wiederum in die Vorproben und die eigentlichen Untersuchungen aufgeteilt sind.

Die Voruntersuchung verlangt die Bestimmung gewisser Kennzahlen, die über die chemische Zusammensetzung der Droge noch nichts Eindeutiges aussagen, die aber doch eine allgemeine Übersicht über die Bestandteile der Pflanze geben, und vor allem erkennen lassen, ob ein zur Untersuchung vorliegendes Drogenpulver durch Beimischungen verunreinigt ist.

Zu diesen Voruntersuchungen gehört:

1. Die Bestimmung der Trockensubstanz.
2. Die Bestimmung des Aschengehaltes und der in Salzsäure unlöslichen Asche.
3. Die Bestimmung des Extraktgehaltes.

1. Die Bestimmung der Trockensubstanz.

Als Trockensubstanz bezeichnet die Pharmacopoea Helvetica, Editio Quinta (Ph. H. V), die Menge des beim Erhitzen eines Stoffes auf 103—105° verbleibenden Rückstandes.

Man muss sich darüber im Klaren sein, dass beim Trocknen bei 103—105° der Gewichtsverlust der Droge erstens von ihrem Wassergehalt und zweitens von ihrem Gehalt an bei dieser Temperatur flüchtigen Stoffen abhängt.

Die Bestimmung der Trockensubstanz wurde nach den Vorschriften der Ph. H. V ausgeführt. Dabei haben wir die folgenden Zahlen erhalten:

	I.	II.	Mittel
Eingewogene Droge:	2,0145 g	2,0211 g	
Getrocknete Droge:	1,8580 g	1,8670 g	
Gewichtsverlust:	0,1565 g	0,1541 g	0,1553 g
In Prozenten:	7,8 %	7,6 %	7,7 %

Der Gewichtsverlust betrug im Mittel aus zwei Versuchen 7,7 %, die Trockensubstanz somit 92,3 %.

Zur Erreichung der Gewichtskonstanz war ein Trocknen von 6—7½ Stunden notwendig.

Um festzustellen, wie gross der effektive Wassergehalt der Droge sei, wurden wiederum nach Angaben der Ph. H. V ungefähr 2 g (genau gewogen) in einem getrockneten, tarierten Wägegläschen im Phosphorpentoxyd-Exsiccator getrocknet und gewogen.

Wir sind dabei zu folgenden Werten gekommen:

	I.	II.	Mittel
Eingewogene Droge:	2,0110 g	2,0718 g	
Getrocknete Droge:	1,8827 g	1,9247 g	
Gewichtsverlust:	0,1283 g	0,1471 g	0,1377 g
In Prozenten:	6,4 %	7,1 %	6,8 %

Der Gewichtsverlust betrug in diesem Falle, als Mittel aus zwei Versuchen 6,8 %, die Trockensubstanz somit 93,2 %.

Zur Erreichung der Gewichtskonstanz musste 14 Tage im Phosphorpentoxyd -Exsiccator getrocknet werden.

Da die Differenz der beiden Bestimmungen (Trocknen im Exsiccator und bei 103—105°) nicht einmal ganz 1 % der untersuchten Menge beträgt, so kann angenommen werden, dass die Droge ausser Wasser keine anderen bei 103—105° flüchtigen Stoffe enthalte. (Klein, l. c.)

2. Die Bestimmung des Aschengehaltes und der in Salzsäure unlöslichen Asche.

Unter „Aschengehalt" versteht man die Menge des nichtflüchtigen, kohlefreien Rückstandes, der beim vorsichtigen Verbrennen eines Stoffes hinterbleibt. Die Asche wurde nach den Vorschriften der Ph. H. V bestimmt. Wir haben dabei folgende Resultate erhalten:

	I.	II.	III.
Eingewogene Droge:	2,0017 g	2,0211 g	2,0145 g
Asche:	0,0787 g	0,0774 g	0,0755 g
In Prozenten der Trockensubstanz:	4,26 %	4,15 %	4,06 %

Das Mittel aus den drei Versuchen ergab einen Aschengehalt von 4,15 %, berechnet auf die Trockensubstanz.

Zur Bestimmung der in Salzsäure unlöslichen Asche verfuhren wir ebenfalls nach den Vorschriften der Ph. H. V.

Dabei erhielten wir die folgenden Zahlenwerte:

	I.	II.	III.
Eingewogene Droge:	2,0017 g	2,0211 g	2,0145 g
In Salzsäure unlösliche Asche:	0,0060 g	0,0056 g	0,0052 g
In Prozenten der Trockensubstanz:	0,3 %	0,3 %	0,3 %

Wir erhielten also hier, ebenfalls als Mittel aus drei Versuchen einen in Salzsäure unlöslichen Aschengehalt von 0,3 % berechnet auf die Trockensubstanz.

Die in Salzsäure lösliche oder physiologische Asche ist gleich der Differenz zwischen Gesamtasche und in Salzsäure unlöslicher Asche und beträgt in unserem Falle 3,8 %.

Im Anschluss an die Bestimmung des Aschengehaltes führten wir eine Aschenanalyse aus. Zu diesem Zwecke wurde ein grösseres Quantum Droge ohne jeglichen Zusatz verascht. Die Asche war fast weiss und zeigte nur eine schwach bräunliche Tönung. Wir zogen sie mehrmals mit heissem Wasser aus und filtrierten. In der wässrigen Lösung konnten die folgenden Jonen nachgewiesen werden:

1. *Natrium.* Die Lösung am Platindraht in eine nicht leuchtende Flamme gebracht, färbte diese deutlich und andauernd gelb.
2. *Kalium.* Beim Betrachten der Flammenfärbung durch ein Kobaltglas erschien deutlich die rosaviolette Färbung des Kaliums.

   Die wässrige Lösung gab mit einer frisch bereiteten 10 %igen Natriumkobaltinitritlösung sofort einen gelben Niederschlag von Natriumkaliumkobaltihexanitrit.

   Kalium konnte auch bei der Untersuchung der Extrakte nachgewiesen werden.
3. *Phosphat.* Wurde die Lösung mit konzentrierter Salpetersäure und Ammoniummolybdatlösung (Ph. H. V) gemischt und im Wasserbad erhitzt, so entstand innerhalb kurzer Zeit ein gelber, kristallinischer Niederschlag von Ammoniumphosphormolybdat.
4. *Chlorid.* Die mit verdünnter Salpetersäure versetzte Lösung bildete beim Zusatz von 4 Tropfen Silbernitratlösung (0,1-n) einen käsigen Niederschlag von Silberchlorid, der sich in Ammoniak löste.
5. *Sulfat.* Bariumnitratlösung (0,5-n) erzeugte in der mit verdünnter Salpetersäure versetzten Lösung einen Niederschlag von Bariumsulfat.

Hierauf wurde die in Wasser unlösliche Asche mit verdünnter Salzsäure behandelt und filtriert. Im Filtrat konnten, nachdem die Säure mit Ammoniak abgestumpft worden war, die folgenden Jonen nachgewiesen werden:

1. *Magnesium.* 2 cm^3 des noch schwach salzsauren Filtrates + 1 cm^3 Ammoniumchloridlösung (10 %) + 1 cm^3 verdünntes Ammoniak + 2 cm^3 Ammoniumkarbonatlösung (ca. 2-n) wurden gemischt und filtriert. 3 cm^3 des Filtrates wurden mit 1 cm^3 Natriumphosphatlösung (6 %) versetzt. Innerhalb kurzer Zeit entstand ein weisser kristallinischer Niederschlag von Magnesium-Ammoniumphosphat.

2. *Kalzium.* Die mit Ammoniak und einer 3,5 %-igen Ammoniumoxalatlösung vermischte Lösung gab innerhalb einer Minute einen weissen, kristallinischen Niederschlag von Kalziumoxalat, der in Essigsäure und Natronlauge unlöslich war, sich aber in verdünnter Salzsäure löste.

3. *Eisen.* Die Lösung wurde mit verdünnter Salzsäure und Ferroziankaliumlösung (5 %) vermischt. Es trat sofort eine Blaufärbung auf und nach einigem Stehen setzte sich ein blauer Niederschlag von Berlinerblau ab.

4. *Silikat.* Zum Nachweis der sich in der Salzsäure unlöslichen Asche befindlichen Silikate wurden diese nach der Methode von Fichter (25) in Kieselsäure überführt. Die Kieselsäure löste sich nicht in Ammoniak, dagegen langsam in Natronlauge und Sodalösung.

   In der Phosphorsalzperle bildete sie ein sogenanntes Kieselskelett.

   Als weiterer Nachweis wurde ein Teil der in Salzsäure unlöslichen Asche mit Kalziumfluorid und konzentrierter Schwefelsäure in einem Platintiegel erhitzt. Es bildete sich stechend riechendes Siliziumfluorid, welches einen Wassertropfen an einem Glasstab infolge der Bildung von Kieselsäure trübte.

In der Asche konnten somit nachgewiesen werden:
Natrium, Kalium, Magnesium, Kalzium, Eisen, Silizium, Chlorid, Sulfat und Phosphat.

3. Die Bestimmung des Extraktgehaltes.

Unter dem Extraktgehalt einer Droge versteht man diejenige Menge an Inhaltsstoffen, die in einem bestimmten Lösungsmittel löslich sind.

Klein (22) bezeichnet als übliche Methode zur Bestimmung des Extraktgehaltes das Auskochen am Rückflusskühler von 1 g Droge mit 50 cm^3 Lösungsmittel während 2 Stunden. Nachher wird filtriert, das Lösungsmittel abgedampft und bei 103—105° getrocknet. Der Autor weist allerdings darauf hin, dass eventuell in der Pflanze enthaltene, bei 103—105° flüchtige Stoffe verloren gehen.

Da uns nicht bekannt war, ob die zu untersuchenden Sklerotien solche Stoffe enthielten, wählten wir, um eine möglichst schonende Behandlung sicherzustellen, die Perkolation zur Bestimmung des Extraktgehaltes. Die Extraktion wurde nach den Vorschriften der Ph. H. V ausgeführt. Der dabei erhaltene Auszug wurde im Vakuum unterhalb 50° zur Trockne eingedampft und gewogen. Für unsere Untersuchungen gebrauchten wir die folgenden Lösungsmittel:

1. Petroläther.
2. Aether.
3. 95 %-igen Spiritus.
4. 75 %-igen Methylalkohol.

Der Versuch, den Extraktgehalt auch mit Wasser auf diese Weise zu bestimmen, misslang, da die Droge soviel Schleim enthält, dass eine Perkolation mit Wasser, auch nach versuchsweisem Mischen mit dem mehrfachen an gereinigtem Sand, unmöglich war.

Es muss hier auch noch erwähnt werden, dass die Methode schonend, aber sehr zeitraubend ist, da bis zur völligen Erschöpfung der Droge 10 bis 14 Tage ununterbrochen perkoliert werden muss.

Die Ergebnisse der Bestimmungen, berechnet auf die Trockensubstanz sind die folgenden:

1.	Mit Petroläther:	2,5 % Extraktgehalt.
2.	Mit Aether:	2,2 % Extraktgehalt.
3.	Mit 95 %-igem Spiritus:	10,2 % Extraktgehalt.
4.	Mit 75 %-igem Methylalkohol:	15,3 % Extraktgehalt.

B. Hauptuntersuchungen.

1. Vorproben.

Bevor wir zu den eigentlichen Untersuchungen schritten, führten wir eine Reihe von Vorproben aus, aus welchen sich Schlüsse auf einzelne Pflanzeninhaltsstoffe ziehen lassen.

Zu diesem Zwecke erwärmten wir 10 g der gepulverten Droge mit 100 g Wasser auf 50—60°, liessen erkalten und filtrierten. Das Filtrieren bereitete grosse Schwierigkeiten, da der in der Droge enthaltene Schleim die Filter immer wieder verstopfte.

Mit dem Filtrat führten wir die folgenden Reaktionen aus:

a) **Prüfung des pH:** Die Lösung reagierte gegen blaues Lakmuspapier schwach sauer und zeigte mit Mercks Universalindikatorpapier bestimmt einen pH von 6,0—6,5.

b) **Prüfung auf Gerbstoff:** 1. Einen Teil der Lösung versetzten wir mit einigen Tropfen Ferrisulfat. Da keine Färbung eintrat, kann man mit der Abwesenheit von Gerbstoffen rechnen.

2. Zur Prüfung auf Phloroglucingerbstoffe versetzten wir einige cm^3 der Lösung mit Vanillinsalzsäure. Da keine Rötung eintrat, kann auch mit der Abwesenheit von Phloroglucingerbstoffen gerechnet werden.

c) **Prüfung auf die Fällbarkeit mit Bleiazetat und Bleiessig:** Gibt man zu der Lösung Bleiazetat, so tritt ein reichlicher, voluminöser Niederschlag auf, der von Säuren, Pflanzenschleimen oder Eiweisstoffen hervorgerufen sein kann. Der Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat mit Bleiessig bis zur alkalischen Reaktion versetzt. Ein auftretender Niederschlag könnte von Gummi, einigen Glykosiden usw. herrühren. Die Reaktion verlief negativ, was auf die Abwesenheit von Gummi schliessen lässt.

d) **Prüfung auf reduzierende Substanzen:** Zu einem Teil der Lösung gaben wir frisch bereitete Fehlingsche Lösung und erhitzten. Das Resultat dieser Reaktion war nicht eindeutig. Die Fehlingsche Lösung wurde erst nach längerem Stehen in ganz kleinem Masse reduziert.

Ferner wurde die Lösung mit Salzsäure erhitzt und nachher mit Fehlingscher Lösung versetzt. Auch diese Reaktion auf Polysaccharide konnte nicht als eindeutig positiv angesprochen werden, da auch hier erst nach längerem Stehen der Flüssigkeit ein kleiner Niederschlag von Cuprooxyd beobachtet werden konnte.

e) **Prüfung auf Alkaloide:** Zur Prüfung auf Alkaloide wurde 10 g Droge mit 100 g 1%-iger Salzsäure auf 60—70° erhitzt und filtriert. Das Filtrat wurde mit allgemeinen Alkaloidreagenzien geprüft. Das Ergebnis war folgendes:

mit 70%-iger Perchlorsäure:	kristallinischer Niederschlag.
mit Jodjodkalium:	kein Niederschlag.
mit Mayers Reagens:	kein Niederschlag.
mit Ferrozyankalium:	kein Niederschlag.
mit Quecksilberchlorid:	kein Niederschlag.
mit Sublimat-Pikrinsäure:	kein Niederschlag.

Der negative Ausgang dieser Reaktionen (der Niederschlag mit Perchlorsäure rührt von dem in der Droge reichlich vorkom-

menden Kaliumchlorid her) beweist die Abwesenheit von Alkaloiden.

f) **Prüfung auf Saponine:** Diese Prüfung wurde folgendermassen ausgeführt: 10 g der gepulverten Droge wurden mit einer 1%-igen Sodalösung geschüttelt, um eventuell vorhandene Saponine unter Schaumbildung in Lösung zu bringen.

Der sich zeigende Schaum liess die für Saponine typische bienenwabenartige Struktur vermissen, zudem verschwand er nach ungefähr ¾ Stunden, was ebenfalls darauf deutete, dass es sich nicht um Saponinschaum handelte. Von der Durchführung des Hämolyseversuches haben wir abgesehen, da er nach den Angaben von Kofler (26) nicht als unbedingt beweisend gilt. Wir konnten diesen Versuch umso eher weglassen, als Hadders und Wehmer (27) angeben, dass bei den Pilzen überhaupt noch nie Saponine nachgewiesen werden konnten.

Da die auf Saponine geprüfte Lösung nach Ansäuren und längerem Kochen klar blieb, ist die Anwesenheit von Eiweiss nicht wahrscheinlich.

g) **Prüfung auf Glykoside:** Die nach der Methode von O. Dafert (l. c.) vorgenommene Prüfung auf Blausäure abspaltende Stoffe ergab ein negatives Resultat.

h) **Wasserdampfdestillation:** Im Rahmen der Vorproben wurde die Droge auch der Wasserdampfdestillation unterworfen und zwar

1. einer Destillation der unbehandelten Droge mit strömendem Wasserdampf und
2. einer Destillation der mit Kaliumhydroxyd versetzten Droge.

1. Wasserdampfdestillation der unbehandelten Droge.

30 g der grob gepulverten Droge wurden mit Wasser angerührt und solange mit Wasserdampf destilliert, bis ungefähr 500 cm^3 Destillat übergegangen waren.

Die Untersuchung des Destillates zeigte, dass dieses nur aus Wasser bestand, welches höchstens so minime Mengen anderer Bestandteile enthielt, dass diese vernachlässigt werden konnten. Die Untersuchung wurde darum auch nicht weitergeführt.

2. Wasserdampfdestillation der mit Kaliumhydroxyd behandelten Droge.

Für die Durchführung dieser Destillation wurden 30 g Droge mit Wasser angerührt und soviel Kaliumhydroxyd zugegeben, dass die Flüssigkeit etwa 1 % davon enthielt. Dann wurde mit Wasserdampf solange destilliert, bis ungefähr 500 cm^3 Destillat übergegangen waren. Das Destillat fiel schon

während der Destillation durch seinen penetranten Gestank auf. Wir vermuteten, dass derselbe von Trimethylamin herrühren könnte, das mit anderen, ebenfalls stark riechenden Stoffen vermischt sei. Das Destillat reagierte alkalisch und gab mit Nesslers Reagens eine starke, braune Fällung. Es wurde mit Salzsäure genau neutralisiert und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Es hinterblieb eine grössere Menge einer Kristallmasse, die hauptsächlich aus Ammoniumchlorid bestand. Es wurde versucht, die Chlorhydrate eventuell vorhandener, flüchtiger Alkylamine auf Grund ihrer verschiedenen Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln voneinander zu trennen. Dieser Versuch misslang, da die grosse Menge von Ammoniumchlorid überall störend auftrat.

Wir versuchten hierauf das Ammoniak nach der Methode von François (28) von den Alkylaminen zu trennen. Das erwähnte Verfahren beruht darauf, dass sich Ammoniak mit gelbem Quecksilberoxyd zu Ammoniummercurioxyd verbindet, während die primären, sekundären und tertiären Amine nicht reagieren.

Auch diese Methode führte zu keinem positiven Ergebnis, da vermutlich ausser den Aminen Stoffe vorhanden waren, die den normalen Ablauf der Reaktion verhinderten oder zum mindesten störten. Wir haben diese Versuche nicht weitergeführt, da zu wenig Substanz vorlag. Immerhin kann angenommen werden, dass Trimethylamin durch Lauge aus der Droge frei gemacht werden kann.

i) **Mikrosublimation:** Als letzte Vorprobe versuchten wir mit Hilfe der Mikrosublimation eine Trennung verschiedener Drogeninhaltsstoffe zu erreichen.

Zuerst unterwarfen wir die unbehandelte, gepulverte Droge der Mikrosublimation nach der Methode von Tunmann (29). Die Sublimate wurden bei verschiedenen Temperaturen zwischen 100 und 300° untersucht. Sie bildeten aber bis 200° nur wasserhelle, nicht kristallisierende Tröpfchen, bei höherer Temperatur gleiche Tröpfchen von gelbbrauner Farbe.

Da die Methode nach Tunmann als ungenau betrachtet werden muss, führten wir noch auf anderem Wege eine Mikrosublimation durch.

Wir legten das Kupferblättchen, welches die Droge enthält, auf die Heizplatte eines Koflerblockes (30), bedeckten mit einem Objektträger und erhitzten durch Veränderung des elektrischen Widerstandes. Auf diese Weise gelingt es ohne Mühe, die Sublimationstemperatur zu steigern, oder längere Zeit auf derselben Höhe zu halten. Ausserdem gewährt diese Methode eine genaue Ablesung der Temperatur.

Unsere Versuche, die wir mit der behandelten, sowie mit der durch Phosphorsäure angesäuerten Droge durchführten, ergaben die gleichen negativen Resultate, wie jene nach der Methode von Tunmann.

2. Eigentliche Untersuchungen.

a) Die Untersuchung des Petrolätherextraktes.

Die bei der Bestimmung des Extraktgehaltes erhaltenen Resultate zeigten uns, dass sowohl mit Petroläther als auch mit Aether hauptsächlich das in der Droge enthaltene Fett extrahiert werden kann. Die beiden Extrakte zeigen nicht nur im Bezug auf ihre Menge, sondern auch in ihrem Aussehen, in ihrer Löslichkeit usw. so grosse Ähnlichkeit, dass wir uns entschlossen, ausser für die quantitativen Bestimmungen, eine Mischung der beiden Extrakte zu untersuchen.

Der Petrolätherextrakt wurde durch Perkolation nach den Vorschriften der Ph. H. V gewonnen. Der Extrakt ist dunkelgrünbraun und flüssig, enthält aber feste Partikelchen. Sein Geruch ist schwach und nicht unangenehm.

Theoretisch können in ihm die folgenden Pflanzenbestandteile enthalten sein: Fett und fettes Oel, Wachs, ätherisches Oel, Farbtoffe, Phytosterin, seltener, wenn sie in freiem Zustande vorhanden sind, Alkaloide, Glykoside und harzige Körper.

Die Ergebnisse der Wasserdampfdestillation und der Trockensubstanzbestimmung lassen erkennen, dass in der Droge kein ätherisches Oel vorhanden ist.

aa) Prüfung auf Alkaloide und Glykoside.

Zur nochmaligen Prüfung auf Alkaloide wurde ein Teil des Extraktes mit einer Mischung von 0,5 cm^3 verdünnter Salzsäure und 50 cm^3 Wasser leicht erwärmt und geschüttelt. Nach Abscheidung des salzsauren, wässrigen Teiles wurde dieser mit Mayers Reagens versetzt. Es entstand kein Niederschlag, was erneut die Abwesenheit von Alkaloiden beweist.

Ein weiterer Teil des Petrolätherextraktes wurde mit verdünnter Salzsäure gekocht. Die abfiltrierte, salzsaure Lösung wurde auf Kohlehydrate geprüft.

Wir versetzten zu diesem Zwecke 1 bis 2 cm^3 der Lösung mit der gleichen Menge einer 20%-igen, spirituösen Lösung von α-Naphtol und unterschichteten mit konzentrierter Schwefelsäure. Ein violetter oder blauer Ring in der Berührungszone, der das Vorhandensein von Kohlehydraten, beziehungsweise Glykosiden anzeigen sollte, trat nicht auf. Demnach kann das Fehlen von Glykosiden in diesem Extrakt als bewiesen betrachtet werden.

Zur näheren Kennzeichnung des Fettes schien uns die Bestimmung einiger Zahlenwerte unerlässlich, so die Bestimmung der Säurezahl und der Verseifungszahl.

bb) **Bestimmung der Säurezahl.**

Die Säurezahl gibt die Anzahl mg Kaliumhydroxyd an, welche die freie Säure von 1 g Substanz binden. Sie ist für Fette nicht konstant und nicht charakteristisch, kann also zur Identifizierung nicht herangezogen werden (31).

Wir haben bei unseren Versuchen je nach Alter und Aufbewahrungsart des Fettes so unterschiedliche Resultate erhalten, dass wir von deren Wiedergabe absehen.

cc) **Bestimmung der Verseifungszahl.**

Anders verhielt es sich mit der Verseifungszahl. Sie gibt die Anzahl mg Kaliumhydroxyd an, welche die freie und die bei der Verseifung abgespaltene Säure von 1 g Substanz zu binden vermag.

Zur Bestimmung der Verseifungszahl wurden ca. 1 g Substanz (genau gewogen) mit 20 cm^3 weingeistiger 0,5-n Kalilauge verseift und nach Zusatz von 10 bis 15 Tropfen Thymolblau mit 0,5-n Salzsäure titriert. Die dabei erhaltenen, genauen Zahlenwerte sind die folgenden:

	I.	II.	III.
Gramm Fett:	2,7573 g	1,7825 g	1,1247 g
cm^3 Kalilauge:	17,75 cm^3	11,60 cm^3	7,20 cm^3
Titer der Lauge:	0,9851	0,9851	0,9851
Verseifungszahl:	174	180	181

Als Mittel aus den drei Versuchen erhielten wir für den Petrolätherextrakt eine Verseifungszahl von 178.

dd) **Bestimmung des Unverseifbaren und Prüfung auf Sterine.**

Wir schritten hierauf zur Bestimmung des Unverseifbaren. Unter dem Unverseifbaren versteht man die Bestandteile eines Fettes oder fetten Öles, welche beim Verseifen mit Lauge nicht wasserlöslich werden. Die Bestimmungen wurden nach den Vorschriften der Ph. H. V durchgeführt.

Wir haben dabei folgende Werte erhalten:

	I.	II.	III.
Gramm Fett:	4,3358 g	3,0896 g	4,1470 g
Unverseifbares:	0,5463 g	0,4170 g	0,5474 g
In Prozenten:	12,6 %	13,5 %	13,2 %

Als Mittel der drei Bestimmungen erhielten wir 13,1 % Unverseifbares.

Enthält ein Fett Sterine, so finden sich diese normalerweise im Unverseifbaren. Wir führten zum Nachweis der Sterine die folgenden Farbreaktionen aus (31):

Reaktion nach Hager-Salkowski: Man löst einige Zentigramm Substanz, in unserem Falle Unverseifbares, in Chloroform und schüttelt mit dem gleichen Volumen konzentrierter Schwefelsäure. Die Chloroformlösung färbt sich bei Gegenwart von Phytosterinen blutrot, dann kirschrot bis purpurn, während die Schwefelsäureschicht grün fluoresziert.

Ergebnis: Das Chloroform blieb farblos, während sich die Schwefelsäure rotbraun färbte.

Reaktion nach Liebermann: Man löst die Substanz in Essigsäureanhydrid und versetzt nach dem Abkühlen tropfenweise mit konzentrierter Schwefelsäure, wobei eine sterinhaltige Lösung erst rosenrot, dann blau wird.

Ergebnis: Die Lösung wurde schmutzig rotbraun. Ein Übergang in Blau fand nicht statt.

Reaktion nach Neuberg: In einer Lösung der Substanz in ca. 1,5 cm^3 absolutem Alkohol wird ein Stückchen Rhamnose von Stecknadelkopfgrösse unter Erwärmen gelöst und nach dem völligen Erkalten mit dem gleichen Volumen konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet. An der Berührungsfläche entsteht beinahe sofort ein himbeerfarbener Ring; beim Vermischen färbt sich die Flüssigkeit intensiv rot.

Ergebnis: Dieser Versuch ergab ein deutlich positives Resultat.

Reaktion nach Whitby: 2 cm^3 einer 1 bis 2 mg Sterin enthaltenden Chloroformlösung werden zu 2 cm^3 eines Gemisches von 50 Volumen konzentrierter Schwefelsäure und 1 Volumen Formalin gegeben und geschüttelt. Die obere Schicht ist kirschrot und wird nach Abtrennung mit 2 bis 3 Tropfen Essigsäureanhydrid blau. Die Färbung geht nach einer Stunde in Grün über. Die untere Schicht ist braunrot mit intensiv grüner Fluoreszenz.

Ergebnis: Die Flüssigkeiten färben sich schwach, aber deutlich positiv.

Digitonidreaktion: 1 g des geschmolzenen Unverseifbaren wurde bei 60—70° mit 2 cm^3 einer 1%-igen Lösung von Digitonin in 96%-igem Alkohol vermischt. Nach halbstündigem Erwärmen war noch kein Niederschlag entstanden.

Mit den unklaren Resultaten obiger Reaktionen kann die Anwesenheit von Sterinen nicht bewiesen werden. Immerhin ist sie anzunehmen, da gerade die Pilzsterine die sogenannten charakteristischen Farbreaktionen nicht oder umgekehrt geben. Zum Beispiel sei an die umgekehrte Salkowskische Reaktion des Ergosterins erinnert (32).

ee) **Bestimmung der Fettsäuren.**

Neben dem Unverseifbaren untersuchten wir auch die Fettsäuren. Ihre Gewinnung geschah folgendermassen:

Die bei der Bestimmung des Unverseifbaren zurückbleibende Seifenlösung wurde mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert. Die höheren Fettsäuren sind in Wasser unlöslich und fallen aus. Sie wurden zuerst mit 100 cm^3 und dann noch dreimal mit je 50 cm^3 Aether ausgeschüttelt. Die vereinigten Aetherauszüge wurden nach dreimaligem Ausschütteln mit je 5 cm^3 Wasser über Natriumsulfat getrocknet und in ein trockenes, genau gewogenes Kölbchen filtriert. Das Natriumsulfat und das Filter wurden mit Aether nachgewaschen. Nach dem Abdestillieren des Aethers wurde im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und hernach gewogen.

4,3358 g Fett lieferten mit dieser Methode 3,3407 g Fettsäuren, das heisst der untersuchte Petrolätherextrakt enthielt 77 % in Wasser unlösliche Fettsäuren.

Die auf diese Weise gewonnenen Fettsäuren haben eine rotbraune Farbe und erstarren bei gewöhnlicher Temperatur. Wir haben die Fettsäuren noch weiter untersucht. Zuerst trennten wir die festen von den flüssigen Säuren und zwar mit der Bleisalz-Alkoholmethode (31).

Wir lösten 5 g des Fettsäuregemisches in heissem, 95%-igem Alkohol und setzten eine heisse Lösung von 1,5 g Bleiazetat in 95%-igem Alkohol zu. Das Gemisch, dessen Volumen 100 cm^3 betragen soll, wurde erkalten und dann noch über Nacht bei 15° stehen gelassen. Dann wurde der Niederschlag abgesaugt und mit 95%-igem Alkohol gewaschen, bis das Filtrat auf Zusatz von Wasser klar blieb. Dann spülten wir ihn mit etwa 100 cm^3 Alkohol in das Becherglas zurück, versetzten mit 0,5 cm^3 Eisessig, erhitzten zum Sieden, liessen auf 15° abkühlen, filtrierten und wuschen die umkristallisierten Bleiseifen wie oben. Der so gereinigte Niederschlag wurde wiederum in das Becherglas gebracht und das Filter mit Aether in dasselbe abgespült. Die Bleisalze wurden hierauf mit verdünnter Salpetersäure zerlegt, die Schichten im Scheidetrichter getrennt, die Fettsäurelösung mit Wasser gewaschen, bis dieses nicht mehr sauer reagierte, und der Aether vertrieben. Das zurückbleibende Säuregemisch wurde im Vakuum getrocknet.

Die alkoholischen Filtrate enthalten die flüssigen Säuren zum Teil in Form ihrer Bleisalze. Die freien Säuren wurden daraus abgeschieden und für sich untersucht.

Im Gegensatz zu der Säurezahl der Fette ist die Säurezahl einer Fettsäure konstant. Sie kann deshalb zur Identifizierung beziehungsweise zur Prüfung des Reinheitsgrades

von Fettsäurepräparaten dienen. Da sie eine Funktion des Molekulargewichtes ist, kann dieses aus ihr errechnet werden.

Zur Bestimmung der Säurezahl wurden ungefähr 1 g Substanz in 25 cm^3 absolutem Alkohol gelöst und mit 10—15 Tropfen Thymolblau versetzt. Dann wurde mit weingeistiger Kalilauge bis zur Grünblaufärbung titriert.

Die dabei erhaltenen Werte sind die folgenden:

Eingewogene g Fettsäure:	0,8739 g
cm^3 0,5-n Kalilauge:	6,375 cm^3
Titer der Lauge:	0,9851

Die Säurezahl oder, wie sie auch genannt wird, die Neutralisationszahl beträgt somit 202.

Daraus ergibt sich nach der Formel (31):

$$\text{Molekulargewicht} = \frac{56108}{\text{Säurezahl}}$$

ein mittleres Molekulargewicht von 278.

Wir prüften hierauf die festen Fettsäuren auf ihren Gehalt an ungesättigten Säuren. Die einfachste Prüfung besteht in der Bestimmung der Jodzahl.

Unter der Jodzahl versteht man die Prozente Halogen, berechnet als Jod, welche ein Fett oder fettes Oel, oder in unserem Falle eine Fettsäure zu addieren vermag. Ihre Bestimmung wurde nach den Angaben der Ph. H. V ausgeführt.

Die festen Fettsäuren gaben keine Jodzahl, das heisst, es sind keine ungesättigten Säuren vorhanden.

Das Fehlen der Jodzahl und das errechnete mittlere Molekulargewicht weisen auf die beiden in Pflanzenfetten sehr oft vorkommenden Säuren hin, nämlich auf Stearin- und Palmitinsäure.

Zum Nachweis von Stearinsäure lösten wir etwa 1 g des Fettsäuregemisches, das aus Alkohol in glänzenden Blättchen kristallisierte und undeutlich zwischen 62 und 70° schmolz, in 100 cm^3 bei 0° mit Stearinsäure gesättigtem Alkohol und liessen über Nacht bei 0° stehen. Am nächsten Morgen wurde die Lösung gelinde geschüttelt, noch eine halbe Stunde der Ruhe überlassen und dann filtriert. Dabei wurde genau darauf geachtet, dass die Temperatur nie über 0° stieg. Die ausgeschiedenen Kristalle wurden getrocknet und ihr Schmelzpunkt bestimmt (31). Dieser lag bei 71°. Ein Mischschmelzpunkt mit reiner Stearinsäure gab keine Depression. Somit kann die Anwesenheit von Stearinsäure als bewiesen betrachtet werden.

Die Prüfung auf Anwesenheit von Palmitinsäure wurde folgendermassen durchgeführt:

1 g festen Fettsäuregemisches wurde in 200 cm³ 94%-igem Alkohol gelöst, auf Eis gestellt und nach mehreren Stunden filtriert. Das Filtrat wurde auf die Hälfte eingedampft, mit einer weingeistigen Lösung von 0,030 g Magnesiumazetat versetzt und eine Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Aus dem Filtrat wurde durch weiteres Konzentrieren und auf Zusatz von Wasser Fettsäure abgeschieden und der Schmelzpunkt bestimmt. Da dieser nicht mit dem der Palmitinsäure übereinstimmte, lösten wir die Säure noch einmal in Weingeist, versetzten mit einer weingeistigen Lösung von 0,01 g Magnesiumazetat und verfuhren im übrigen wie oben. Der Schmelzpunkt stimmte nach der dritten, gleichen Behandlung mit demjenigen der Palmitinsäure überein (63°). Ein Mischschmelzpunkt mit reiner Palmitinsäure gab ebenfalls keine Depression. Das Vorhandensein von Palmitinsäure ist somit anzunehmen (31).

Zur Untersuchung der flüssigen Fettsäuren bestimmten wir zuerst die Jodzahl. Sie betrug 80. Die Jodzahl weist auf die Anwesenheit einer ungesättigten Säure. Wir stellten hierauf die Elaidinreaktion an, indem wir die flüssigen Fettsäuren in einem Reagensglas mit gleich viel Salpetersäure und einigen Stückchen Kupferdraht zusammenbrachten. Die Reaktion fiel positiv aus, das heisst das Oel erstarrte zu einer festen Masse.

Die Resultate deuten auf Oelsäure hin, die im Pflanzenreich frei und hauptsächlich als Glyzerid sehr verbreitet ist.

Um die Oelsäure rein zu erhalten, wurden die flüssigen Fettsäuren mit 0,5-n weingeistiger Kalilauge neutralisiert und die Oelsäure mit Lithiumazetat gefällt. Das Lithiumsalz wurde mit Aether und Benzol ausgewaschen und aus Alkohol umkristallisiert. Dann wurde das Salz, das aus Alkohol in kleinen Kristallbüscheln kristallisierte, mit verdünnter Salzsäure zerlegt und die freie Säure im Scheidetrichter mit Aether ausgeschüttelt. Wir erhielten eine kleine Menge eines geruchlosen, leicht gelb gefärbten Oels, das bei ungefähr 4° erstarrte.

Wir stellten damit noch folgende Farbreaktionen an (33):

1. Eine Lösung von 1 Tropfen der Substanz in konzentrierter Schwefelsäure wurde mit einer 1%-igen Lösung von Vanillin in Weingeist überschichtet. Es entstand in der Berührungszone ein violetter Ring, und beim Umschütteln färbte sich der Weingeist violett.

2. Wir lösten etwas Zellulose in konzentrierter Schwefelsäure und gaben einige Tropfen der zu untersuchenden Substanz und dann tropfenweise unter Schütteln Wasser hinzu. Es entstand eine intensive rote Färbung, die beim weiteren Zusatz von Wasser in Violett überging und schliesslich verschwand.

Der positive Ausfall dieser Reaktionen, zusammen mit den übrigen Ergebnissen deuten auf die Anwesenheit von Oelsäure.

ff) Nachweis von Glyzerin.

Nachdem Stearin-, Palmitin- und Oelsäure nachgewiesen waren, versuchten wir noch das Glyzerin, das wahrscheinlich durch die Verseifung frei geworden war, nachzuweisen.

Zu diesem Zwecke filtrierten wir das nach dem Verseifen des Petrolätherextraktes und Ausschütteln des Unverseifbaren und der Fettsäuren zurückbleibende Glyzerinwasser und machten es mit Kaliumkarbonat schwach alkalisch. Im Vakuum wurde darauf bei höchstens 80° bis zur sirupösen Konsistenz eingedampft. Der Rückstand wurde mit 10 g geglühtem Natriumsulfat vermischt und das erkaltete, fast trockene Pulver im Soxhletschen Apparat mit Schliffen während 4 Stunden mit Aceton extrahiert, das vorher mit ausgeglühtem Kaliumkarbonat getrocknet worden war. Im Vakuum wurde vom Aceton befreit und bei 75 bis höchstens 80° getrocknet. Wir erhielten so ein konzentriertes, allerdings durch kleine Mengen acetonlöslicher Fremdstoffe bräunlich gefärbtes Glyzerin. Die Färbung liess sich auch, nachdem das Glyzerin in Wasser gelöst worden war, nicht durch Kohle entfernen. Wie sich aber zeigte, konnten alle gewünschten Reaktionen trotzdem durchgeführt werden.

Zum qualitativen Nachweis wurde das Glyzerin in Dioxyaceton übergeführt (33) und dieses durch Farbreaktionen mit konzentrierter Schwefelsäure und Phenolen oder Codein nachgewiesen. Ausserdem gelang die Ausfällung von Glyzerosazon mit Phenylhydrazin. Reduktionsreaktionen konnten mit Nesslers Reagens und Fehlingscher Lösung erhalten werden.

Der positive Ausfall aller dieser Reaktionen bestätigt die Anwesenheit von Glyzerin, beziehungsweise Dioxyaceton.

b) Die Untersuchung des Aetherextraktes.

Wie wir schon zu Beginn der Untersuchung des Petrolätherextraktes ausführten, vereinigten wir den Aetherextrakt, nachdem er auf seinen eventuellen Gehalt an Alkaloiden und Glykosiden geprüft worden war, mit dem Petrolätherextrakt.

Die Prüfung auf Alkaloide und Glykoside wurde gleich wie beim Petrolätherextrakt ausgeführt. Sie ergab nur negative Resultate. Es sind also auch im Aetherextrakt weder Alkaloide noch Glykoside enthalten.

c) Die Untersuchung des mit 95%-igem Spiritus erhaltenen Extraktes.

Durch die Voruntersuchungen konnte festgestellt werden, dass sowohl in dem mit 95%-igem Spiritus, als auch in dem mit 75%-igem Methylalkohol hergestellten Extrakt die gleichen Stoffe, nur in verschiedenen Mengen vorhanden waren. Wir haben darum, abgesehen von den Prüfungen auf Alkaloide, nur den mengenmässig grösseren Methylalkoholextrakt untersucht.

Zur Prüfung auf Alkaloide lösten wir vom 95%-Spiritusextrakt eine kleine Menge in verdünnter Salzsäure, filtrierten und versetzten das Filtrat mit Mayers Reagens. Es entstand kein Niederschlag, also sind keine Alkaloide in diesem Extrakt.

d) Die Untersuchung des mit 75%-igem Methylalkohol erhaltenen Extraktes.

Mit Methylalkohol konnten 15,3 % der Droge extrahiert werden. Der im Vakuum getrocknete Extrakt ist ein dunkelbrauner, angenehm nach Bouillon riechender, von kristallinischen Anteilen durchsetzter Brei. Zu seiner Untersuchung benützten wir die sogenannte Bleimethode, die, wenn sie auch nicht als absolut beste Methode bezeichnet werden kann, doch gute Resultate liefert.

Der Methylalkoholextrakt wurde in Wasser gelöst und filtriert. Das Filtrat wurde in der Siedehitze in geringem Überschusse mit Bleiazetatlösung versetzt. Der ausfallende Bleiniederschlag wurde abfiltriert und gewaschen, bis das Filtrat nicht mehr sauer reagierte.

Der Bleiniederschlag war weder in Weingeist noch in Essigsäure löslich. Ein Teil ging bei der Behandlung mit Ammoniak in Lösung. Die ammoniakalische Lösung wurde abfiltriert und mit Essigsäure angesäuert. Dann wurde durch Einleiten von Schwefelwasserstoff das Blei gefällt und abfiltriert. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade eingeengt und am Schlusse im Schwefelsäure-Exsikkator der Kristallisation überlassen. Die sich dabei ausscheidenden Kristalle schmeckten sauer. Sie waren in Wasser und Alkohol leicht löslich, in Aether dagegen schwer. Der Schmelzpunkt lag bei 145°. Wir vermuteten, dass es sich um Zitronensäure handeln könnte und stellten darum alle die von L. Rosenthaler (33) für diese Säure als typisch bezeichneten Fällungs- und Farbreaktionen an. Ausserdem kristallisierten wir die Säure mehrmals aus Aether um, und erhielten am Schlusse ein Präparat, das den Schmelzpunkt

156—157° zeigte und das auch bei einem Mischschmelzpunkt mit reiner Zitronensäure keine Depression hervorrief.

Mit dem positiven Ausfall aller dieser Reaktionen war das Vorliegen von Zitronensäure bewiesen.

Der in Ammoniak unlösliche Teil des Bleiniederschlages wurde in Wasser suspendiert und durch Einleiten von Schwefelwasserstoff das Blei gefällt. Das vom Bleisulfid befreite Filtrat wurde auf dem Wasserbade eingeengt und im Vakuum über Schwefelsäure der Kristallisation überlassen. Es blieben leicht braun gefärbte Kristalle zurück, die sauer schmeckten und in Wasser und Weingeist leicht, in Aether dagegen schwer löslich waren. Ihr Schmelzpunkt lag bei ungefähr 180°. Wir vermuteten, dass es sich um Oxalsäure handeln könnte. Durch mehrfaches Umkristallisieren aus Aether erhielten wir Kristalle, die bei 194,5° schmolzen und im Mischschmelzpunkt mit reiner Oxalsäure keine Depression gaben. Auch fielen alle Reaktionen auf Oxalsäure nach L. Rosenthaler (33) positiv aus.

Es handelt sich bei dem isolierten Stoff somit um Oxalsäure.

Das Filtrat der Bleifällung wurde durch Einleiten von Schwefelwasserstoff und nachherigem Filtrieren vom überschüssigen Blei befreit. Die dabei erhaltene Flüssigkeit, welche ausser der durch den Analysengang bedingten Anwesenheit von Essigsäure noch Glykoside, Bitterstoffe, Alkaloide, Zuckerarten, Salze und dergleichen enthalten konnte, wurde zur weiteren Behandlung in drei Teile geteilt.

Die Säure des ersten stumpften wir mit Natriumkarbonat soweit ab, dass er nur noch schwach sauer reagierte und behandelten ihn weiter nach der Stas-Ottoschen Methode.

Die zu untersuchende Flüssigkeit wurde zuerst mit Aether ausgeschüttelt. Dann wurde mit Natronlauge alkalisch gemacht und noch einmal gleich verfahren. Zuletzt wurde die Lösung noch einmal nach Zusatz von Ammoniak, mit Aether ausgeschüttelt. Bei unseren Versuchen erhielten wir aus keinem der erwähnten Aetherauszüge einen Rückstand. Es kann also behauptet werden, dass in dieser Fraktion weder Alkaloide noch Glykoside enthalten seien.

Für die weiteren Untersuchungen kamen also nurmehr Zuckerarten, Salze und andere in Wasser lösliche Stoffe in Frage. Bitterstoffe fielen ausser Betracht, da die Flüssigkeit nicht bitter, sondern eher salzig-süss schmeckte.

Auf Zuckerarten prüften wir, indem wir die schon mehrmals beschriebene und ausgeführte α-Naphtol-Schwefelsäurereaktion anstellten. Sie fiel sowohl beim 95%-Spiritusextrakt, als auch beim 75%-Methylalkoholextrakt schwach positiv aus, das heisst, dass in diesen beiden Extrakten kleine Mengen von Kohlehy-

draten enthalten sein können. Als weitere Prüfung kam die reduzierende Wirkung auf Fehlingsche Lösung in Frage. Wir erhitzten sowohl die unbehandelten, als auch die einige Zeit mit verdünnter Säure gekochten Extrakte mit frisch bereiteter Fehlingscher Lösung. Es trat in keinem Fall eine Reduktion ein. Im weiteren wurde geprüft, ob das Kohlehydrat mit Hefe vergärbar sei. Mehrere Versuche gaben aber durchwegs negative Resultate. Es gelang auch nicht durch Behandlung mit Phenylhydrazin und essigsaurem Natron in der Siedehitze ein Phenylosazon zu erhalten.

Es scheint sich also hier um einen jener kohlehydratartigen Stoffe zu handeln, die in Pilzen sehr verbreitet sind, deren Konstitution aber noch nicht weiter untersucht ist. In diesem Zusammenhange darf vielleicht auch darauf hingewiesen werden, dass es de Bary (9) gelang, in den Hyphen des Myzels mit Hilfe der Erreraschen Jodreaktion Glykogen nachzuweisen.

Der zweite Teil des wässrigen Filtrates wurde zur weiteren Untersuchung mit Weingeist versetzt. Dabei fiel ein weisser Niederschlag aus. Dieser wurde abfiltriert und aus viel siedendem Weingeist umkristallisiert. Beim Erkalten des Alkohols kristallisierten lange, farblose Nadeln aus, die einen Schmelzpunkt von 160—165° zeigten. Wir vermuteten, dass Mannit vorliegen könnte und prüften durch einen Mischschmelzpunkt. Es trat dabei keine merkliche Reduktion ein. Wir lösten hierauf einen Teil der Kristalle in 50 %-iger Schwefelsäure und schüttelten die Lösung mit Benzaldehyd. Nach etwa 12stündigem Stehen bei 0° hatten sich die seidenglänzenden Nadeln des Tribenzylidenmannits abgeschieden. Sie wurden aus siedendem Alkohol umkristallisiert und zeigten dann einen Schmelzpunkt von 220—222° (34). Der verbleibende, noch unreine Mannit wurde ebenfalls aus Alkohol umkristallisiert, bis er einen Schmelzpunkt von 169—170° gab.

Aus der nach dem Abscheiden des Mannits verbleibenden Lösung kristallisierten nach langem Stehen farblose, durchsichtige Kristallwürfel. Da sie bei gelindem Glühen nicht verbrannten, musste es sich um einen anorganischen Stoff handeln. Die violette Flammenfärbung wies auf ein Kaliumsalz hin. Durch ein Kobaltglas betrachtet verschwand die Färbung nicht, sondern erschien rotviolett. Wir lösten einige Kristalle in Wasser und versetzten mit einer Lösung von Natriumkobaltinitrit. Es entstand sofort ein gelber Niederschlag von Kaliumnatriumkobalthexanitrit. In der gelblichen, wässrigen Lösung erzeugte ein Zusatz von Silbernitratlösung einen weissen, käsigen Niederschlag von Silberchlorid, das in Salpetersäure unlöslich war. Bei den Kristallen handelte es sich somit um Kaliumchlorid.

e) **Quantitative Mannitbestimmung.**

Das reichliche Vorkommen von Mannit in den untersuchten Sklerotien veranlasste uns, den Gehalt der Droge an Mannit quantitativ zu bestimmen.

Hiezu kochten wir 50 g der grobgepulverten Droge mit 300 g 75 %-igem Methylalkohol während zwei Stunden am Rückflusskühler. Hierauf wurde heiss filtriert. Die gleiche Manipulation wurde mit je 200 g Lösungsmittel noch viermal wiederholt. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum vom Methylalkohol befreit und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit Wasser aufgenommen und filtriert. Dann wurde zum Sieden erhitzt und mit Bleiazetat im geringen Überschuss versetzt. Der ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert und mit heissem Wasser gut ausgewaschen. Das Filtrat wurde mit Kohle entfärbt. Hierauf wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft, mit gereinigtem, geglühtem Seesand verrieben und während 8 Stunden mit absolutem Alkohol soxhletiert. Aus der erkalteten Lösung kristallisierte der Mannit aus. Durch Eindampfen der Mutterlauge und nochmaliges Umkristallisieren erhielten wir ein weiteres Quantum Mannit. Das Gewicht der nurmehr leicht bräunlichen Kristalle betrug 2,17 g. Die Droge enthält also ungefähr 4,7 % Mannit, berechnet auf die Trockensubstanz.

Versuche, die Fällung des Mannits als Tribenzylidenmannit zur Gehaltsermittlung zu verwenden, scheiterten, weil diese Fällung ausserordentlich stark von der Konzentration der verwendeten Lösungen abhängt. Verschiedene von uns durchgeführte Versuche haben gezeigt, dass die Fällung meistens keine quantitative ist und somit zur Gehaltsbestimmung nicht in Frage kommt.

IV. PHARMAKOLOGISCHER TEIL.

Wie wir schon in der Einleitung zu dieser Arbeit erwähnt haben, ist die Arbeit Sokolovs die einzige, die sich mit der pharmakologischen Wirkung von Sclerotinia Libertiana befasst. Da uns die Originalarbeit, die in russischer Sprache abgefasst ist, nicht zugänglich war, mussten wir uns mit einem Referat begnügen, das in den „Berichten der gesamten Physiologie und experimentellen Pharmakologie" (1) erschienen war. Wir zitieren es im folgenden:

„Der Pilz Sclerotinia Libertiana wirkt giftig, geringer, aber gleichartig wie Mutterkorn, stärker auf Mäuse als auf Frösche. Extrakte erweitern die Gefässe des isolierten Kaninchenohres,

der Froschextremitäten und der Froschleber. Aufgüsse wirken an diesen Objekten nicht einheitlich. Am isolierten Meerschweinchenuterus treten nach Applikation der Extrakte des Pilzes (ohne Angabe der Konzentration) tetanische Kontraktionen auf, am isolierten Darm von Kaninchen und Katze wirkt das Präparat erschlaffend. Am isolierten Froschherzen sind die Wirkungen nicht einheitlich. Amplitude wird erniedrigt, Rhythmus wird verlangsamt. Nach Einbringen in Ringer wird die Wirkung aufgehoben. Gelegentlich tritt aber eine Erhöhung der Amplitude und Frequenz ein. Bei intravenöser Eingabe am Warmblütler wird der Blutdruck erniedrigt. Die Atmungsfrequenz wird bei vermindertem Atemvolumen stark beschleunigt."

Leider sind, laut Referat, auch in der Originalarbeit keine Angaben über Art und Konzentration der Extrakte enthalten, mit denen Sokolov gearbeitet hat. Auch sind die Lösungsmittel nicht angegeben, mit denen die Extrakte hergestellt wurden, ja, es ist nicht einmal erwähnt, ob es sich bei den untersuchten Extrakten um solche aus Sklerotien handle. Immerhin kann dies angenommen werden, da die Wirkung mit derjenigen des Mutterkorns, das heisst den Sklerotien von Claviceps purpurea verglichen wird.

Wir haben darum zuerst die, aus der mit Petroläther entfetteten Droge gewonnenen Spiritusextrakte untersucht. Einer derselben war mit 90%-igem, der andere mit 70%-igem Spiritus hergestellt worden. Beide Extrakte zeigten, sowohl am nicht graviden Kaninchenuterus, wie auch am Meerschweinchen-Dickdarm und Uterus (alle in vitro) deutliche Kontraktionen. Da aber das Lösungsmittel allein ebenfalls Reaktionen der untersuchten Organe hervorrief, suchten wir einen Extrakt herzustellen, dessen Menstruum die unerwünschten Nebenerscheinungen nicht gab.

Eine vorzügliche Vorschrift für einen derartigen Auszug gibt die amerikanische Pharmakopöe (35). Die Methoden dieses Arzneibuches liefern, unter grösstmöglicher Schonung aller Inhaltsstoffe einen Fluidextrakt, dessen Lösungsmittel in den angewandten Verdünnungen keinen Einfluss mehr auf die untersuchten Organe ausübte.

Der Extrakt wurde nach der Vorschrift für Mutterkornfluidextrakt wie folgt hergestellt:

„Man gibt 1000 g der grobgepulverten Droge in einen zylindrischen Perkolator und perkoliert so lange mit Petroläther, bis einige Tropfen des Perkolates nach dem Verdunsten auf einem Filtrierpapier keinen Fettfleck mehr hinterlassen. Hierauf befreit man die Droge durch Ausbreiten an der Luft vom Petroläther.

Dann teilt man die entfettete Droge in drei Teile von 500 g,

300 g und 200 g. Die erste Portion (500 g) wird mit einer genügenden Menge des Lösungsmittels befeuchtet. Das Menstruum erhält man durch Mischen von 20 Volumen Salzsäure (35—37 %) mit 980 Volumen verdünntem Alkohol (42 Gew.-%). Das befeuchtete Pulver wird in einen passenden Perkolator eingefüllt und 15 Minuten stehen gelassen. Hierauf beginnt man mit der Perkolation. Der Vorlauf von 200 cm^3 wird beiseite gestellt. Im folgenden werden 5 Portionen zu je 300 cm^3 gesondert aufgefangen und in der Reihenfolge ihrer Herstellung numeriert.

Nun befeuchtet man den zweiten Anteil des Drogenpulvers (300 g) mit einer genügenden Menge der ersten 300 cm^3-Portion des Perkolates, das bei der Perkolation des vorhergehenden Teiles erhalten wurde. Dann wird die Perkolation genau gleich durchgeführt, wie beim ersten Anteil. Als Menstruum verwendet man in der Reihenfolge ihrer Numerierung, die 5 Portionen zu je 300 cm^3 die bei der Darstellung des ersten Perkolates erhalten worden waren. Nötigenfalls kann noch frisches Lösungsmittel gebraucht werden. Die ersten 300 cm^3 des nun abfliessenden Perkolates werden wiederum beiseite gestellt und die folgenden 5 Portionen zu je 200 cm^3 in der Reihenfolge ihrer Herstellung numeriert.

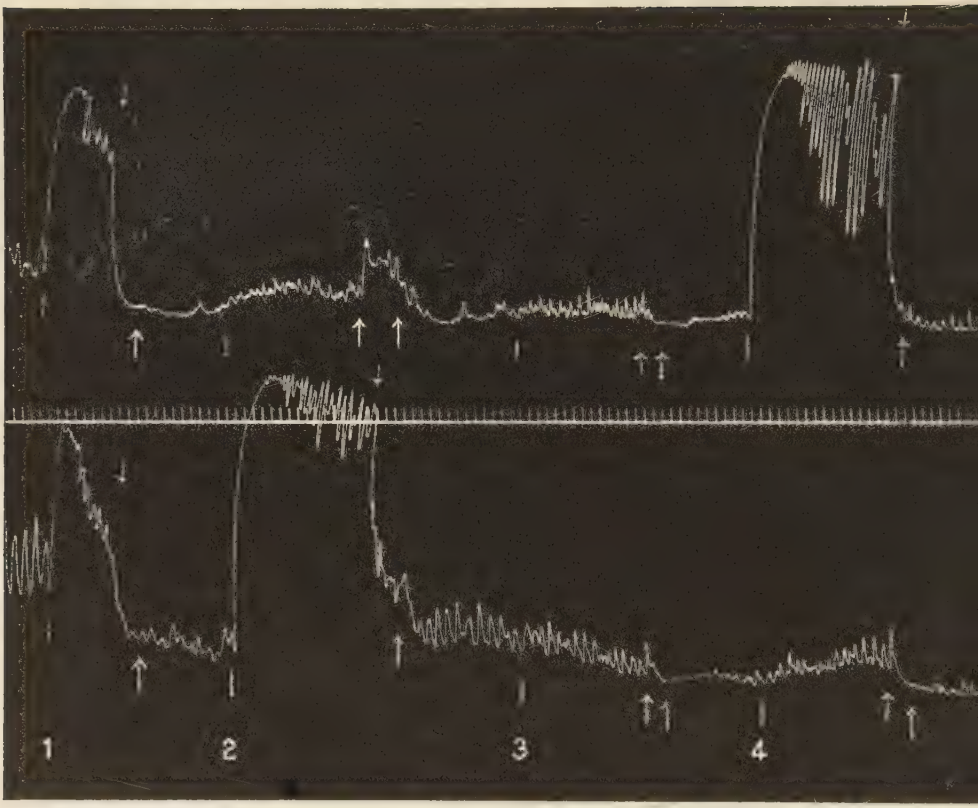
Hierauf wird die dritte Portion des Drogenpulvers (200 g) mit einer genügenden Menge des ersten, bei der Perkolation des zweiten Drogenanteils erhaltenen Portion zu 200 cm^3 befeuchtet. Die Perkolation wird in der genau gleichen Weise durchgeführt wie die beiden ersten Male, indem man die 200 cm^3-Portionen in der Reihenfolge ihrer Numerierung als Menstruum verwendet. Die zuerst ablaufenden 500 cm^3 werden beiseite gestellt.

Die drei bei der Perkolation eines jeden Drogenanteils beiseite gestellten Vorläufe von 200, 300 und 500 cm^3 werden gemischt und auf —14° abgekühlt. Vom gefrorenen Fett wird abfiltriert, wobei die Temperatur bei —14° zu halten ist. Das Filtrat wird mit der nötigen Menge Lösungsmittel bis zu 1000 cm^3 ergänzt."

Bei dem auf diese Art und Weise erhaltenen Fluidextrakt entspricht 1 cm^3 einem Gramm Droge.

Es hat sich nun gezeigt, dass der Drogenauszug noch in einer effektiven Verdünnung von 1 : 1000 am isolierten Kaninchenuterus eine stark kontrahierende Wirkung hervorruft (Abbildung 1).

Abbildung 1.



Versuch am isolierten Kaninchenuterus.
Pfeil bedeutet Auswaschen des Präparates.

Obere Kurve: Bei 1 wird Adrenalin 1 : 5 000 000 geprüft. Bei 2 wird Basergin 1 : 2 500 000, bei 3 das Lösungsmittel für den Extrakt und bei 4 der nach der amerikanischen Pharmakopöe hergestellte Extrakt 1 : 1000 untersucht. (Tonuserhöhung.)

Untere Kurve: Bei Marke 1 = Adrenalin 1 : 5 000 000. Bei Marke 2 wird der Extrakt 1 : 250 untersucht. Bei Marke 3 wird das Lösungsmittel für den Extrakt geprüft. Bei Marke 4 wird Basergin 1 : 1 000 000 zum Vergleich gegeben.

Als Vergleich kann die mit Adrenalin in einer Verdünnung von 1 : 5 000 000 und die mit Basergin (dem von Stoll isolierten, reinen Secalealkaloid Ergobasin, in Form des Tartrates) in einer Verdünnung von 1 : 1 000 000 erzielte Wirkung dienen. Die Kon-

traktion gleicht derjenigen, die wir mit Adrenalin erhalten haben und ist bedeutend stärker als die mit Basergin in den verabreichten Dosen erzielte.

In der Droge ist somit ein Stoff enthalten, der selbst in grossen Verdünnungen noch eine relativ starke Wirkung hat. Es kann vorweggenommen werden, dass es sich bei diesem unbekannten, wirksamen Prinzip von Sclerotinia Libertiana nicht um das niedrigmolekulare Ergobasin, beziehungsweise Ergometrin handelt, denn wir fanden in der Droge überhaupt keine Alkaloide und dementsprechend auch keine, auch für Egobasin charakteristische positive Kornutinprobe (Ph. H. V).

Würde es sich anderseits um einen Vertreter der hochmolekularen Mutterkornalkaloide vom Typus des Ergotamins handeln, so müsste es gelingen, im pharmakologischen Versuch die für diese Alkaloidgruppe typische Adrenalinhemmung oder Adrenalinumkehr nachzuweisen.

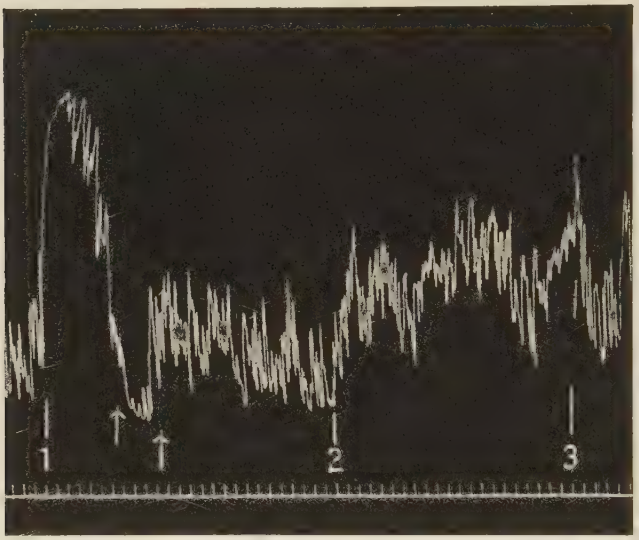
Diese biologische Reaktion beruht auf der negativ-sympathicotropen Wirkung der genannten Mutterkornalkaloide und ist für diese spezifisch.

Adrenalin wirkt in vitro und in vivo kontrahierend auf den Kaninchenuterus. Die Secalealkaloide haben die Eigenschaft, diese Adrenalinwirkung zu hemmen, ja sie sogar umzukehren. Diese, für die Mutterkornalkaloide vom Ergotamintypus spezifische Erscheinung wurde zuerst von Dale (36) beobachtet und beschrieben, und von Rothlin (37) weiter präzisiert.

Normalerweise stellt man den Versuch so an, dass man auf einen mit Adrenalin auf seine Erregbarkeit geprüften Uterus in vitro die oben genannten Alkaloide einwirken lässt und nachher von neuem die Adrenalinwirkung feststellt. Ist diese deutlich gehemmt oder umgekehrt, so kann mit Sicherheit angenommen werden, dass der Uterus der Einwirkung von Secalealkaloiden vom Ergotamintypus ausgesetzt war.

Abbildung 2 zeigt, wie die durch Ergotamin hervorgerufene Adrenalinhemmung, beziehungsweise Adrenalinumkehr im Kurvenbild zum Ausdruck kommt.

Abbildung 2.

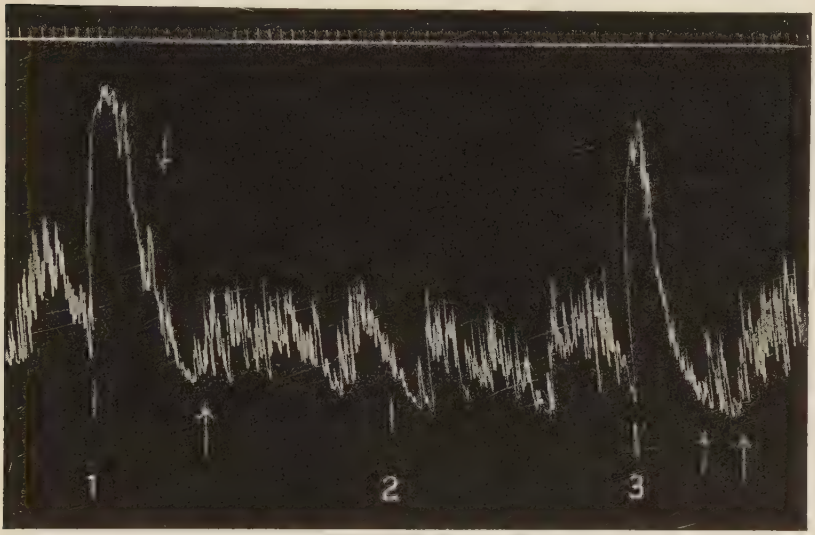


Versuch am isolierten Kaninchenuterus.
Pfeil bedeutet Auswaschen des Präparates.
Bei 1 Prüfung mit Adrenalin 1 : 30 000 000. Bei 2 Einwirkung von Ergotamintartrat 1 : 100 000 000. Bei 3 erneute Prüfung mit Adrenalin 1 : 40 000 000 (Adrenalinumkehr.)

Bei Marke 1 wurde der Uterus mit Adrenalin 1 : 30 000 000 auf seine Erregbarkeit geprüft. Das Organ reagierte auf diese Adrenalindose mit einer starken Kontraktion. Bei Marke 2 wurde Ergotamintartrat 1 : 100 000 000 zugegeben und 15 Minuten einwirken gelassen. Auch hier lässt sich eine deutliche Kontraktion beobachten. Bei Marke 3 wurde wiederum Adrenalin 1 : 40 000 000 zugefügt. An Stelle der Kontraktion tritt in diesem Falle eine merkbare Erschlaffung. (Adrenalinumkehr.)

Das Ergebnis des mit unserem Extrakt analog durchgeführten Versuches zeigt Abbildung 3.

Abbildung 3.



Versuch am isolierten Kaninchenuterus.
Pfeil bedeutet Auswaschen des Präparates.
Bei 1 wird Adrenalin 1 : 30 000 000 geprüft. Bei 2 wird der mit 70 %-Spiritus hergestellte Extrakt untersucht. Bei 3 wird erneut die Adrenalinwirkung 1 : 40 000 000 geprüft. (Keine Adrenalinumkehr!)

Ein nicht gravider Kaninchenuterus wurde mit Adrenalin in einer Verdünnung von 1 : 30 000 000 auf seine Empfindlichkeit geprüft. Dann liessen wir den mit 70 %-igem Spiritus durch Perkolation hergestellten Extrakt (1 Gramm entspricht 10 Gramm Droge) in einer Verdünnung von 1 : 100 auf das Organ einwirken. Der dabei erzielte Effekt ist nur sehr gering. Die erneute Zugabe von Adrenalin in einer Verdünnung von 1 : 40 000 000 bewirkte wiederum eine starke Kontraktion, das heisst, es ist weder eine Adrenalinhemmung noch eine Adrenalinumkehr zu beobachten.

Verschiedene andere Versuche zeitigten die gleichen Resultate. Es folgt daraus, dass keine Alkaloide vom Ergotamintypus vorliegen und dass die uteruskontrahierende Wirkung nicht von Secalealkaloiden herrühren kann. Wir erhielten somit auch hier die Bestätigung unserer chemischen Untersuchungen, bei denen es uns nicht gelungen ist, Alkaloide nachzuweisen.

In analoger Weise, wie man durch Ergotamin die Wirkung des Adrenalins am isolierten Kaninchenuterus zu hemmen vermag, kann man mit Belladonna-Alkaloiden, den typischen parasympathischen Hemmungsstoffen, eine Cholin-, beziehungsweise Azetylcholinwirkung aufheben.

Wir liessen zu diesem Zwecke auf einen Uterus, dessen Erregbarkeit durch Adrenalin geprüft worden war, Belladonna-Alkaloide einwirken. Wir benützten hiezu die als Bellafolin-Sandoz im Handel befindlichen reinen Alkaloide von Atropa Belladonna. Die darauf folgende Einwirkung unseres Extraktes rief immer noch eine Kontraktion hervor.

Wenn die kontrahierende Wirkung der Extrakte auf einem Gehalt an Cholin oder Azetydcholin beruhen würde, so müsste diese nach einer vorangegangenen Behandlung mit Atropin, respektive Bellafolin, verschwinden oder wenigstens viel schwächer auftreten.

Verschiedene Versuche haben eindeutig gezeigt, dass Bellafolin keine hemmende Wirkung auf die uteruswirksamen Stoffe der untersuchten Droge ausübt. Es kann darum angenommen werden, dass sowohl Cholin als auch Azetylcholin als Inhaltsstoffe nicht in Frage kommen.

Nach all diesen negativen Resultaten stellten wir uns die Frage, ob nicht vielleicht der hohe Kaliumgehalt für die pharmakologische Wirkung der Extrakte verantwortlich zu machen sei. Den Kaliumgehalt können wir aus dem Aschengehalt und deren quantitativen Analyse, die de Bary (9) ausgeführt hat, berechnen. Der Aschengehalt beträgt 4,1 %, der Kaliumgehalt der Asche als K_2O berechnet 25,87 %. Daraus ergibt sich für die Droge ein Gehalt an Kalium von 1,7 %, berechnet als Kaliumchlorid.

Bei der Prüfung der Extrakte auf ihre Wirksamkeit haben wir festgestellt, dass diese in einer effektiven Verdünnung von 1 : 1000 starke Kontraktionen hervorrufen. Das Kalium wäre in diesem Falle, wenn wir unserer Berechnung einen Gehalt von 2 % zugrunde legen würden, in einer Verdünnung von 1 : 50 000 vorhanden. Es scheint uns aber unmöglich, dass Kaliumchlorid in solchen Konzentrationen die auf Abbildung 1 gezeigte Wirkung ausüben kann.

Durch unsere Versuche konnten wir bestätigen, dass die Extrakte der Sklerotien von Sclerotinia Libertiana eine starke, kontrahierende Wirkung auf den Kaninchenuterus ausüben.

Es gelang uns auch zu beweisen, dass diese Wirkung weder von Alkaloiden vom Secaletypus, noch von Cholin, Azetylcholin oder Kalium herrühren kann. Dagegen müssen wir die Frage, welcher Art die wirksame Substanz sei, noch offen lassen.

V. ZUSAMMENFASSUNG.

Im botanischen Teil dieser Arbeit haben wir die einzelnen Entwicklungsstadien des Pilzes Sclerotinia Libertiana beschrieben und dabei darauf hingewiesen, dass dieser Pflanzenschädling in fast allen Ländern und auf fast allen Dicotyledonen gefunden worden ist. Da Sokolov (l. c.) auf die „mutterkornähnliche", uteruskontrahierende Wirkung aufmerksam gemacht hatte, lag die Vermutung nahe, es könnten in der Droge dem Mutterkorn ähnliche Inhaltsstoffe gefunden werden. Wir hielten darum eine eingehende chemische Analyse für angezeigt, besonders da wir in der ganzen uns zur Verfügung stehenden Literatur keine solche Arbeit finden konnten.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen haben aber gezeigt, dass in den Sklerotien keine Alkaloide enthalten sind. Ein anderer grosser Unterschied zwischen Claviceps purpurea und Sclerotinia Libertiana besteht auch im Bezug auf den Fettgehalt; Mutterkorn hat einen durchschnittlichen Gehalt von 30 %, unsere Sklerotien einen solchen von nur 2½ % Fett.

Als weitere Inhaltsstoffe fanden wir in der Droge Oxal- und Zitronensäure, die beide oft als freie Säuren in Pilzen vorkommen. Mannit, den wir im untersuchten Material nachwiesen, findet sich ebenfalls häufig in Pilzen. In unserer Droge waren es aber so grosse Mengen, dass wir eine quantitative Bestimmung für angezeigt hielten. Dabei haben wir einen Gehalt von 4,7 % Mannit ermittelt.

Die Prüfung der physiologischen Wirkung der Extrakte hat die Ergebnisse der chemischen Analyse bestätigt; es konnten auch hier keine Alkaloide gefunden werden. Besonders das Fehlen der für Alkaloide vom Ergotamintypus spezifischen Adrenalinhemmung oder Adrenalinumkehr zeigt deutlich, dass es sich hier um ein anderes, vom Mutterkorn gänzlich verschiedenes, wirksames Prinzip handeln muss.

Wir konnten in unserer Arbeit nachweisen, dass die Uteruskontraktionen auch nicht von Cholin oder Azetylcholin herrühren können. Ebenso konnte die Annahme, die Wirkung beruhe vielleicht auf dem hohen Kaliumgehalt der Droge, widerlegt werden.

VI. LITERATURANGABEN.

1. *S. Sokolov.* „Über die pharmakologischen Eigenschaften von Sklerotinia Libertiana." Pharmakolog. Inst. der Univ. Worones. Russk. fiziol. Z., 12, 289—304 und deutsche Zusammenfassung 305—306, 1929. (Russisch.) Referat in Ber. der ges. Physiologie und experim. Pharmakologie, 52, 672, 1930.
2. *R. Seka.* „Alkaloide." G. Klein: Handbuch der Pflanzenanalyse. Wien, 1933, Bd. 4 I, 701.
3. *J. L. Weimer.* „Two diseases of Udo. (Aralia cordata Thumb.)" Journ. Agric. Research XXV, No. 6, 1923.
4. *A. Osterwalder.* „Weitere Beiträge zur Kenntnis der Krankheiten der Zierpflanzen." Landw. Jahrbuch der Schweiz. XXXI, 1917.
5. *V. Peglion.* „Il male della sclerozio della Forsythia viridissima." Atti R. Accad. Lincei Roma. XXV, 1916.
6. *A. Osterwalder.* „Die Sclerotinia-Krankheit auf Campanula medium." Landw. Jahrbuch der Schweiz. 1915.
7. *J. Rosenbaum.* „Pathogenicity an identity of Sclerot. Libert. and Sclerot. smilacina on Ginseng." Journ. of Agric. Research, V, 1915.
8. *H. Pape.* „Sklerotinia Libertiana als Schädling der Tomatenpflanze." Die Gartenwelt, XXVI, 1922, 306.
9. *A. de Bary.* „Über einige Sklerotien und Sklerotienkrankheiten." Bot. Zeitung, 1886, No. 22—27.

   „Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze usw." Leipzig, 1884, Kap. 2, 5, 7.
10. *O. Appel* und *W. F. Bruck.* „Sklerotinia Libertiana als Schädiger von Wurzelfrüchten." Arbeiten aus der Kaiserl. Biolog. Anstalt für Land- und Forstwesen. Band 5, Heft 4, 1906, 189—203.
11. *G. K. Burgwitz* und *A. M. Eremejeva.* „Über das Verhältnis von Botrytis zu Sklerotinia." Morbi plantarum; Script sect. Phytopath. Hort. Bot. Princip. URSS, XIII, 1924. Referat in: Just, Bot. Jahresbericht 1927, Bd. II.
12. *W. H. Davis.* „Drop of chinese cabbage and common cabbage caused by Sclerot. sclerot. Lib. Mass. (Sclerot. Libertiana Fuckel.)" Phytopathology, XV, 1925.
13. *A. B. Frank.* „Pflanzenkrankheiten." Encyklop. d. Naturwissensch., Breslau, 1880, Bd. I, 485.

   „Die Krankheiten der Pflanzen." Breslau, 1881, 530—538. 2. Auflage, Breslau, 1896, Bd. II, 493.

   „Frühlings Landwirtschaftliche Zeitung." Jahrgang 1881.
14. *C. Boyle.* „Studies in the Physiology of parasitism. VI. Infection by Sclerot. Libert." Annals of Botany, XXXV, 1921.
15. *J. Westerdijk.* „Untersuchungen über Sklerotinia Libertiana Fuckel als Pflanzenparasit." Mededelingen uit het phytopathologisch Laboratorium „Willie Commelin Scholten", Amsterdam, 1911.
16. *M. P. Antokolskaja.* „The races of Sclerot. Libert. on sunflower and other plants." Bull. Plant. Protect. Leningrad, 1932, 5, 39—64. Referat in: Bot. Ctrbl. 1933, N. F. 23, 254.

17. *G. H. Pethybridge.* „Potato Diseases in Ireland." Repr. Journ. Dep. Agric. and Techn. Instr. for Ireland, 1910, X, Nr. 2.

„Investigations on Potato Diseases." Repr. Journ Dep. Agric. and Techn. Instr. for Ireland 1916, XVI, 564—596.

18. *Tichomiroff.* „Peziza Kauffmanniana, eine neue aus Sclerotium stammende und auf Hanf schmarotzende Becherpilzspezies." Bull. Soc. Imp. Natur. de Moscou, XLI, I, 1868, 295. Zit. in: P. Sorauer, „Handbuch der Pflanzenkrankheiten."

19. *J. Behrens.* „Über das Auftreten des Hanfkrebses im Elsass." Zeitschr. für Pflanzenkrankheiten, I, 1891, 208—215.

20. *M. Noack.* „Fungi (Pilze)." P. Sorauer, „Handbuch der Pflanzenkrankheiten." Berlin, 1928, Bd. II, 730.

21. *Peters.* „Erkrankungen der Setzlinge und Stecklinge." Die Gartenwelt, XX, 1916.

22. *G. Klein.* „Handbuch der Pflanzenanalyse." Wien, 1931, Bd. I. 555—598.

23. *O. Dafert.* „Untersuchungs- und Forschungsmethoden der Pharmazie." Berlin, 1930.

24. *L. Rosenthaler.* „Grundzüge der chemischen Pflanzenuntersuchungen." Berlin, 1928.

25. *F. Fichter.* „Anleitung zum Studium der chemischen Reaktionen und der qualitativen Analyse." Stuttgart, 1928.

26. *L. Kofler.* „Die Saponine." G. Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse. Bd. III, 2, 1104.

27. *M. Hadders* und *C. Wehmer.* „Systematische Verbreitung und Vorkommen der Saponine." G. Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse. Bd. III, 2, 1132.

28. *M. Guggenheim.* „Die biogenen Amine." Berlin, 1924, 2. Auflage, 52.

29. *O. Tunmann* und *L. Rosenthaler.* „Pflanzenmikrochemie." Berlin, 1931, 32.

30. *L. u. A. Kofler.* „Mikroskopische Methoden in der Mikrochemie." Wien und Leipzig, 1936.

31. *A. Grün.* „Analyse der Fette und Wachse." Berlin, 1925, Bd. I, 143.

32. *E. Abderhalden.* „Biochemisches Handlexikon." Berlin, 1911, Bd. III, 309.

33. *L. Rosenthaler.* „Der Nachweis der organischen Verbindungen." Stuttgart, 1933.

34. *F. Micheel.* „Chemie der Zucker und Polysaccharide." Leipzig, 1939.

35. Amerikanische Pharmakopöe. XI. Auflage, 1936, 167 und 171.

36. *H. H. Dale.* „On some physiological actions of ergot." Journ. of Physiol., 34, 1906, 163.

37. *E. Rothlin.* „Über das Ergotamin, ein spezifisch wirksames Alkaloid aus dem Mutterkorn." Schweiz. med. Wochenschrift, 1922, Nr. 40 978—981.

„Recherches expérimentales sur l'Ergotamine, Alcaloide spécifique de l'Ergot de Seigle." Archives intern. de Pharmacodynamie et de Therapie. 1923, 459—479.

„Über die pharmakologische und therapeutische Wirkung des Ergotamins auf den Sympathicus." Klinische Wochenschrift, IV. Jahrg., Nr. 30.

„Beitrag zur differenzierenden Analyse der Mutterkornalkaloide." Schweiz. med. Wochenschrift, 1938, Nr. 33, 971 ff.

CURRICULUM VITAE.

Als Sohn des Kaufmanns Rudolf Hediger und seiner Gattin Valerie, geb. Jecker, wurde ich, Hans Franz Hediger, am 6. Januar 1912 in meiner Vaterstadt Basel geboren.

Ich besuchte die Primarschule, das untere Gymnasium und die obere Realschule (Math.-nat. Gymnasium) in Basel und verliess die letztere im Frühjahr 1931 mit dem Maturitätszeugnis Typus C. Hierauf begann ich mit meinen Studien an der Universität Basel. Im Herbst 1933 bestand ich die eidg. Ergänzungsprüfung in Latein und im Frühjahr 1934 das pharmazeutische Vorexamen. Mein Praktikum, vom 1. April 1934 bis 1. Oktober 1935 in der Apotheke des Herrn Ed. Eckstein in Basel, schloss ich mit dem pharmazeutischen Assistentenexamen ab. Das Assistentenjahr absolvierte ich in Fribourg in der Apotheke des Herrn P. Gross. Im Herbst 1936 nahm ich meine Studien an der Universität Basel wieder auf und bestand im Frühjahr 1938 das eidgenössische Staatsexamen. Nach einsemestriger Arbeit an meiner Dissertation arbeitete ich während 9 Monaten in der Spitalapotheke des Bürgerspitals Basel, von wo ich im Frühjahr 1939 zur Universität zurückkehrte. Von diesem Zeitpunkte an arbeitete ich im pharmazeutischen Institut unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Leupin an der vorliegenden Arbeit, die nach mehrmaligen, durch den Aktivdienst bedingten Unterbrüchen im Frühjahr 1941 beendet wurde.

Während meiner Studienzeit besuchte ich Vorlesungen und Praktika bei den Herren Professoren und Dozenten:

Doerr, Erlenmeyer, Fichter, Fischer, Häfliger, Hagenbach, Hunziker, Jezler, Leupin, Portmann, Reichstein, Rothlin, Rupe, Senn, Staub, Violier, Vischer, Zörnig.